

**Patent
Matic**

PatentMatic

Welcome

New Patents

Download Form

Patent Numbers

Kind Codes

Links

Conditions of Use

Patent Details

Number WO 03049713A1 pages - **1**

Title Utilization of dihydropinosylvin and derivatives thereof as tyrosinase inhibitors for skin lightening or as antimicrobial substances for preservation or for the treatment of acne, dandruff or body odors

Pub date 2003-06-19

Inventor Schmaus Gerhard (DE) Hermann Martina (DE) Joppe Holger (DE) Meier Manfred (DE)

Applicant Dragoco Gerberding Co Ag (DE) Schmaus Gerhard (DE) Hermann Martina (DE) Joppe Holger (DE) Meier Manfred (DE)

Also pub. [AU2002366530A1](#) [DE10161253A1](#)
as

Disclosed are new uses of compounds of formula (I) or mixtures of substance comprising one or more compounds of formula (I), wherein R1 and R2 independent of one another, are selected from the group consisting of hydrogen, methyl, straight-chained or branched, saturated or unsaturated alkyl with 2-10 atoms and alkyl interrupted by one or more oxygen and/or sulfur atoms with 2-10 atoms, and R3 and R4, independent of one another, are selected from the group consisting of hydrogen, hydroxy and methoxy. Said compounds are suitable as agents for: (a) inhibiting enzymes selected from the group consisting of tyrosinase, tyrosinase isoenzymes and the mixtures thereof and/or (b) treating microorganisms selected from the group consisting of (i) dandruff-causing microorganisms (ii) body odor-causing microorganisms, (iii) acne-causing microorganisms, (iv) mycosis-causing microorganisms and their mixtures (v). Further disclosed are methods for preserving perishable articles and for cosmetic lightening of the human skin using the above-mentioned compounds.

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
19. Juni 2003 (19.06.2003)

PCT

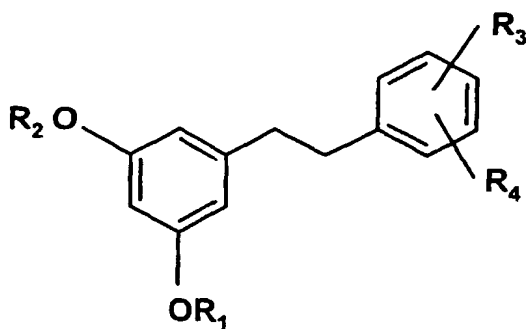
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/049713 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61K 7/32, 31/05 (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): DRAGOCO GERBERDING & CO. AG [DE/DE]; Dragocostr. 1, 37601 Holzminden (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/14041
- (22) Internationales Anmeldedatum: 11. Dezember 2002 (11.12.2002) (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHMAUS, Gerhard [DE/DE]; Herrenburgstrasse 29, 37671 Hötter-Bosseborn (DE). HERRMANN, Martina [DE/DE]; Wilhelm-Raabe-Str. 12, 37603 Holzminden (DE). JOPPE, Holger [DE/DE]; Hauptstr. 16, 37586 Dassel (DE). MEIER, Manfred [DE/DE]; Neue Str. 3, 37699 Fürstenberg (DE).
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 101 61 253.2 13. Dezember 2001 (13.12.2001) DE

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: UTILIZATION OF DIHYDROPINOSYLVIN AND DERIVATIVES THEREOF AS TYROSINASE INHIBITORS FOR SKIN LIGHTENING OR AS ANTIMICROBIAL SUBSTANCES FOR PRESERVATION OR FOR THE TREATMENT OF ACNE, DANDRUFF OR BODY ODORS

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON DIHYDROPINOSYLVIN UND DESSEN DERIVATEN ALS TYROSINASEINHIBITOREN ZUR HAUTAUFFHELLUNG BZW. ALS ANTIMIKROBIELLE SUBSTANZEN ZUR KONSERVIERUNG ODER ZUR BEHANDLUNG VON AKNE, SCHUPPEN ODER KÖRPERGERUCH



(1)

(57) Abstract: Disclosed are new uses of compounds of formula (I) or mixtures of substances comprising one or more compounds of formula (I), wherein R₁ and R₂, independent of one another, are selected from the group consisting of hydrogen, methyl, straight-chained or branched, saturated or unsaturated alkyl with 2-10 C atoms and alkyl interrupted by one or more oxygen and/or sulfur atoms with 2-10 C atoms, and R₃ and R₄, independent of one another, are selected from the group consisting of hydrogen, hydroxy and methoxy. Said compounds are suitable as agents for: (a) inhibiting enzymes selected from the group consisting of tyrosinase, tyrosinase isoenzymes and the mixtures thereof and/or (b) treating

microorganisms selected from the group consisting of (i) dandruff-causing microorganisms; (ii) body odor-causing microorganisms, (iii) acne-causing microorganisms, (iv) mycosis-causing microorganisms and their mixtures (v). Further disclosed are methods for preserving perishable articles and for cosmetic lightening of the human skin using the above-mentioned compounds.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben werden neue Verwendungen von Verbindungen der Formel I oder Substanzmischungen die eine oder mehrere Verbindungen der Formel I umfassen, (I) wobei R₁? und R₂? unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe, die aus - Wasserstoff, - Methyl, -geradkettiges oder verzweigtes, gesättigtes oder ungesättigtes Alkyl mit 2-10 C-Atomen und - durch ein oder mehrere Sauerstoff- und/oder Schwefelatome unterbrochenes Alkyl mit 2-10 C-Atomen besteht, and R₃? and R₄? unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe, die aus - Wasserstoff, -Hydroxy und - Methoxy besteht. Die genannten Verbindungen sind als Mittel zur (a) Inhibierung von Enzymen, die aus der Gruppe ausgewählt sind, die aus Tyrosinase, Tyrosinase-Isoenzymen und deren Mischungen besteht und/oder (b) Behandlung von Mikroorganismen, die aus der Gruppe ausgewählt sind, die aus (i) Schuppen verursachenden Mikroorganismen, (ii) Körpergeruch verursachenden Mikroorganismen, (iii) Akne verursachenden Mikroorganismen, (iv) Mykosen verursachenden Mikroorganismen und deren (v) Mischungen besteht, geeignet. Beschrieben werden auch Verfahren zur Konservierung verderblicher Artikel und zur kosmetischen Aufhellung der menschlichen Haut unter Einsatz der genannten Verbindungen.

WO 03/049713 A1



(74) **Anwalt: STILKENBÖHMER, Uwe;** Eisenführ, Speiser & Partner, Martinistrasse 24, 28195 Bremen (DE).

(81) **Bestimmungsstaaten (national):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),

eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

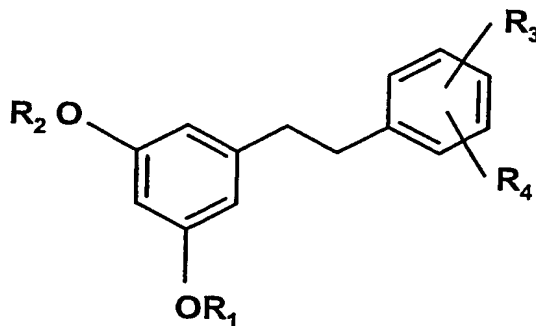
Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

VERWENDUNG VON DIHYDROPINOSYLVIN UND DESSEN DERIVATEN ALS TYROSINASE-INHIBITOREN ZUR HAUTAUFHELLUNG BZW. ALS ANTIMKROBIELLE SUBSTANZEN ZUR KONSERVIERUNG ODER ZUR BEHANDLUNG VON AKNE, SCHUPPEN ODER KÖRPERGERUCH

Die vorliegende Erfindung betrifft primär neue Verwendungen von Dihydropinosylvin und bestimmten Derivaten des Dihydropinosylvin, nämlich von Verbindungen der nachfolgenden Formel 1



1

wobei gilt:

R_1 und R_2 sind unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe, die aus

- Wasserstoff,

- Methyl,
 - geradkettiges oder verzweigtes, gesättigtes oder ungesättigtes Alkyl mit 2-10 C-Atomen und
 - durch ein oder mehrere Sauerstoff- und/oder Schwefelatome unterbrochenes Alkyl mit 2-10 C-Atomen
- besteht, und

R₃ und R₄ sind unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe, die aus

- Wasserstoff,
 - Hydroxy und
 - Methoxy
- besteht.

Im Bereich der kosmetischen Industrie besteht ein ständiger Bedarf an Inhibitoren für bestimmte Enzyme und Mikroorganismen.

Ein Beispiel für ein Enzym, dessen Inhibierung unter verschiedensten Umständen aus kosmetischer Sicht gewünscht wird, ist beispielsweise die Tyrosinase (Phenolase). Es handelt sich bei ihr um eines der Schlüsselenzyme im Melanin-Biogeneseweg. Melanine, welche aus der Aminosäure Tyrosin mittels der Tyrosinase über das L-Dopachinon gebildet werden, sind die für die Hautbräunung verantwortlichen Pigmente. Es ist bekannt, dass man durch Inhibierung der Tyrosinase eine Depigmentierung oder Hautaufhellung bewirken kann, beispielsweise um Sommersprossen oder Altersflecken zu bekämpfen. Die kosmetische Industrie ist daher beständig auf der Suche nach Substanzen, die das Enzym Tyrosinase hemmen und somit einen Schlüsselschritt in der Melaninsynthese, nämlich die Umwandlung von Tyrosin zu L-Dopachinon sowie die anschließende Oxidation zu Dopachinon unterbinden.

Die menschliche Haut wird von einer Vielzahl verschiedener Mikroorganismen besiedelt. Die meisten dieser Mikroorganismen sind nicht pathogen und für den physiologischen Zustand der Haut und für deren Geruch irrelevant. Andere hingegen können den gesunden Zustand der Haut maßgeb-

lich beeinflussen. Einige, die menschliche Hautflora stark beeinflussende Mikroorganismen sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1

Mikroorganismen:	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Achselgeruch; allg. Körpergeruch
<i>Staphylococcus aureus</i>	Atopische Ekzeme; Wundinfektion
<i>Corynebacterium xerosis</i>	Achselgeruch
<i>Brevibacterium epidermidis</i>	Achselgeruch; Fußgeruch
<i>Propionibacterium acnes</i>	Akne
<i>Escherichia coli</i>	Wundinfektionen
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Wundinfektionen
<i>Malassezia furfur</i> (syn. <i>Pityrosporum ovale</i>)	Schuppenbildung
<i>Candida albicans</i>	Allg. Candidosen
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Haut- und Nagelmykosen
<i>Trichophyton rubrum</i>	Haut- und Nagelmykosen
<i>Epidermophyton floccosum</i>	Haut- und Nagelmykosen
<i>Aspergillus niger</i>	Schimmelbefall

Durch den bakteriellen Abbau im Schweiß enthaltener, körpereigener Stoffe wie z.B. ungesättigter Fettsäuren entstehen aus mehr oder minder schwach riechenden Vorstufen unangenehm riechende Zersetzungsprodukte, die das körperliche Wohlbefinden stark beeinflussen können. Zur Verhinderung der Entstehung der für Körpergeruch verantwortlichen Substanzen verwendet man in der Kosmetik Produkte, die entweder die Bildung von Körperschweiß unterbinden (sogenannte Antiperspirantien) oder Substanzen, die das Wachstum der für die Geruchsbildung verantwortlichen Bakterien der menschlichen Haut hemmen (Deodorantien). Bakterienarten wie *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium xerosis* und *Brevibacterium epidermidis* sind maßgeblich für die Bildung von Achsel- und Fußgeruch, bzw. Körpergeruch im allgemeinen verantwortlich. In der kosmetischen Industrie besteht daher ein beständiger Bedarf an neuen Mitteln zur Behandlung dieser und anderer Körpergeruch (einschließlich Achsel- und Fußgeruch) verursachenden Mikroorganismen.

Ein Akne verursachender Mikroorganismus ist *Propionibacterium acnes*, bei dem es sich um einen anaerob wachsenden Keim handelt. Die kosmetische Industrie sucht beständig nach Mitteln zur Behandlung dieses Keimes und anderer Akne verursachender Mikroorganismen.

Alle Bereiche der menschlichen Haut können von Mykosen (insbesondere Dermatomykosen und Nagelmykosen) befallen werden. Besonders häufig sind Hautareale betroffen, auf welchen sich durch das Tragen von Kleidung, Schuhwerk oder Schmuck Feuchtigkeit und Wärme stauen können. Als besonders unangenehm empfunden werden Pilzerkrankungen der Finger- und Fußnägelbereiche. Maßgeblich verantwortlich für die Bildung von Mykosen sind häufig verschiedene *Trichophyton*- und *Epidermophyton*-Arten. Die kosmetische Industrie sucht beständig nach neuen Mitteln zur Behandlung dieser und anderer Mykosen verursachenden Mikroorganismen.

Im Bereich der Haarpflege wird darüber hinaus intensiv nach Substanzen zur Behandlung des für die Schuppenbildung maßgeblich verantwortlichen Keimes *Malassezia furfur* und anderer Schuppen verursachender Mikroorganismen gesucht.

Unter "Behandlung" wird dabei im Rahmen des vorliegenden Textes jede Form der Einflussnahme auf die betreffenden Mikroorganismen verstanden, bei der die Vermehrung dieser Mikroorganismen gehemmt und/oder die Mikroorganismen getötet werden.

In der kosmetischen und auch pharmazeutischen Industrie besteht zudem ein beständiger Bedarf an Mitteln zur Konservierung ansonsten verderblicher kosmetischer oder pharmazeutischer Artikel. Vorzugsweise soll ein derartiges Konservierungsmittel gegen mehrere der in Tabelle 1 aufgeführten Mikroorganismen wirksam sein, um den Parallel-Einsatz weiterer Wirkstoffe unnötig zu machen.

Bei der Suche nach entsprechenden antimikrobiell wirksamen und/oder konservierenden Mitteln ist dabei zu beachten, dass die in kosmetischen und/oder pharmazeutischen Produkten verwendeten Substanzen

- toxikologisch unbedenklich,
 - gut hautverträglich,
 - stabil (insbesondere in den üblichen kosmetischen und/oder pharmazeutischen Formulierungen),
 - vorzugsweise geruchlos und
 - preiswert herstellbar (d.h. unter Einsatz von Standardverfahren und/oder ausgehend von Standardprekursoren)
- sein müssen.

Die Suche nach geeigneten (Wirk-)substanzen, die eine oder mehrere der genannten Eigenschaften in ausreichendem Maße besitzen, ist dem Fachmann dadurch erschwert, dass keine klare Abhängigkeit zwischen der chemischen Struktur einer Substanz einerseits und ihrer biologischen Aktivität gegenüber bestimmten Mikroorganismen (Keimen) sowie ihrer Stabilität andererseits besteht. Des Weiteren gibt es keinen vorhersehbaren Zusammenhang zwischen der antimikrobiellen Wirkung, der toxikologischen Unbedenklichkeit, der Hautverträglichkeit und/oder der Stabilität.

Eine besondere Voraussetzung für den Einsatz einer Wirksubstanz in der Praxis ist ihre Stabilität gegenüber chemischen Substanzen, welche als Begleitstoffe in Kosmetika üblicherweise Anwendung finden, gegenüber dem in der Umgebungsluft enthaltenen Sauerstoff und gegenüber Licht.

Es war daher die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, einen Wirkstoff anzugeben, welcher (a) eine gute antimikrobielle (d.h. inhibierende) Wirkung gegenüber zumindest einem, vorzugsweise aber mehreren der vorstehend diskutierten Mikroorganismen besitzt, (b) eine Tyrosinase-inhibierende Wirkung besitzt, und somit als kosmetischer Hautaufheller bzw. kosmetisches Depigmentierungsmittel einsetzbar ist und (c) gegenüber den Einflüssen von Luft und Licht eine gute Stabilität zeigt.

Überraschenderweise hat sich nun in eigenen Untersuchungen gezeigt, dass die eingangs genannten Verbindungen der Formel 1 (nachfolgend auch als Bisbenzyl-Derivate oder Dihydropinosylvin-Derivate bezeichnet) sowie Substanzmischungen, die eine oder mehrere Verbindungen der

Formel 1 umfassen, wobei die Gruppen R_1 bis R_4 jeweils die oben angegebene Bedeutung besitzen und zur Lösung der gestellten Aufgaben geeignet sind. Sie können dementsprechend als Mittel zur

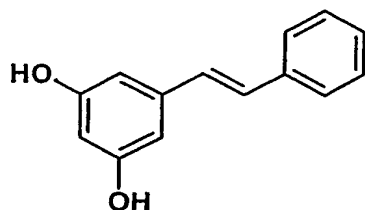
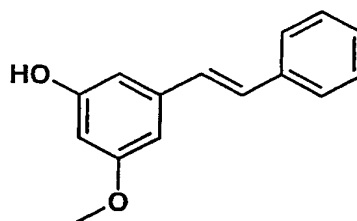
- (a) Inhibierung von Enzymen,
die aus der Gruppe ausgewählt sind, die aus Tyrosinase, Tyrosinase-Isoenzymen und deren Mischungen besteht, und/oder
- (b) Behandlung von Mikroorganismen,
die aus der Gruppe ausgewählt sind, die aus (i) Schuppen verursachenden Mikroorganismen, (ii) Körpergeruch verursachenden Mikroorganismen, (iii) Akne verursachenden Mikroorganismen, (iv) Mykosen verursachenden Mikroorganismen und deren Mischungen besteht,

eingesetzt werden und weisen dabei in kosmetischen und pharmazeutischen Produkten eine außerordentlich hohe Stabilität gegenüber Luftoxidation sowie gegenüber lichtinduzierten Isomerisierungs- und/oder Abbaureaktionen auf.

Aus D.E. Fagboun et al.; *Phytochemistry* 26(12), 3187, 1987 war bereits bekannt, dass Dihydropinosylvin gegenüber beispielsweise *Aspergillus niger* und *Escherichia coli* eine antimikrobielle Wirkung besitzt. Ein Hinweis auf die antimikrobielle Wirkung des Dihydropinosylvin oder einer anderen Verbindung der Formel 1 (mit den angegebenen Bedeutungen der Gruppen R_1 bis R_4) gegenüber den oben genannten weiteren Mikroorganismen ist der Veröffentlichung jedoch nicht zu entnehmen. Auch gibt es keinen Hinweis auf eine Tyrosinase-inhibierende Wirkung von Verbindungen der Formel 1. Insgesamt fehlt jeder Hinweis auf eine Verwendbarkeit von Dihydropinosylvin oder einer anderen Verbindung der Formel 1 als kosmetisches Mittel.

Die antimikrobielle Wirksamkeit der mit den Verbindungen der Formel 1 strukturchemisch verwandten Stilbenderivate wie Pinosylvin (Formel 2) und Pinosylvinmonomethylether (Formel 3) ist bereits seit längerem bekannt (*Nature*, Vol 155; April 14; p. 454; 1945). In der genannten Veröffentlichung

wird beschrieben, dass die in vielen Pinus-Arten natürlich vorkommenden Substanzen Pinosylvin und Pinosylvinmonomethylether eine starke antimikrobielle Wirkung gegenüber verschiedenen Bacillus- und Penicillium-Arten aufweisen.

**2****3**

Über die antimikrobielle Wirksamkeit von Stilbenen vom Typ des Pinosylvins sowie über deren generelle Bedeutung als Phytoalexine wird auch in folgenden Publikationen berichtet: K.Ratanabangkoon et al., J.Sci.Soc.Thailand 2, 202-205 (1976); H.Erdtmann, TAPPI 32(7), 305-310 (1949); C.C.Celimene, Phytochem. 56, 161-165 (2001); T.P. Schultz, Phytochem. 31(11), 3801-3806 (1992).

T. Suga, Phytochem 33(6), 1395-1401 (1993) beschreibt Pinosylvin-Monomethylether und Dihydrogen-Pinosylvin-Monomethylether als nematizide Substanzen. Eine Verwendung der genannten Substanzen als antimikrobieller Wirkstoff oder Tyrosinase-Inhibitor wird jedoch nicht erwähnt.

In der EP 1 029 530 A1 wird die Verwendung von 3,5-Dihydroxystilben und 3-Hydroxystilben als Deodorantien in Kosmetikprodukten beschrieben. Die EP 1 068 864 A1 beschreibt die Verwendung bestimmter Stilbene als Inhibitoren der Glycosidierung bestimmter Proteine (z.B. Hautproteine). Beide EP-Dokumente geben keinen Hinweis auf eine Verwendung der entsprechenden Bisbenzyl-derivate.

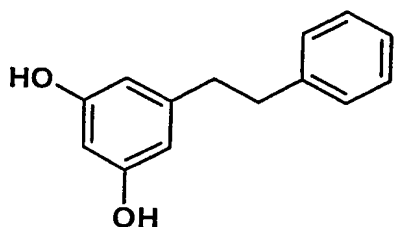
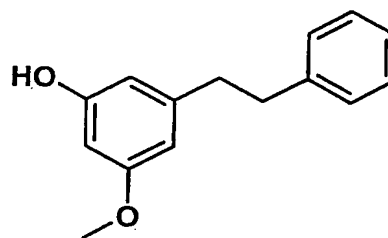
Eigene Untersuchungen zur antimikrobiellen Wirksamkeit von Lösungsmittel-extrakten aus Pinus-Arten sowie daraus isolierten Stilbenderivaten führten zu Ergebnissen, die den aus der Literatur bekannten Resultaten weitgehend entsprechen. Die antimikrobielle Wirksamkeit von stilbenhaltigen Pflanzenextrakten sowie von Pinosylvin und Pinosylvinmonomethylether wurde bestätigt.

Als äußerst nachteilig angesehen wurde jedoch der Umstand, dass die untersuchten Stilbene zu Photoisomerisierungs- und Abbaureaktionen neigen, so dass ihre Verwendung in kosmetischen und pharmazeutischen Produkten in der Praxis allenfalls beschränkt möglich ist. Die eigenen Untersuchungen führten zu dem Ergebnis, dass natürlich vorkommende trans-Stilbene vom Typ des Pinosylvin extrem lichtempfindlich sind und innerhalb kurzer Zeit zu den entsprechenden cis-Verbindungen isomerisieren, zu Cyclobutanderivaten dimerisieren und zu nicht näher spezifizierten Folgeprodukten abbauen. Nicht nur die geringe Stabilität der Stilbene sondern auch die Tatsache, dass ihr toxikologisches Potential und die dermatologischen Risiken der durch Photoisomerisierung und Abbau entstehenden Folgeprodukte nur schwer abschätzbar sind, sind von großem Nachteil für den potentiellen Einsatz von Stilbenen wie Pinosylvin und Pinosylvinmonomethylether in topisch zu applizierenden Produkten.

Überraschenderweise zeigte sich andererseits, dass die Verbindungen der Formel 1 mit den oben angegebenen Bedeutungen der Gruppen R_1 bis R_4 eine hervorragende Stabilität gegenüber Licht und Sauerstoff besitzen und dabei in ihrer antimikrobiellen Wirksamkeit nicht oder zumindest nicht nennenswert hinter Stilbenen wie Pinosylvin und Pinosylvinmonomethylether zurückstehen. Der Einsatz der erfindungsgemäßen Bisbenzyl-Derivate in pharmazeutischen und kosmetischen Mitteln ist daher problemlos möglich.

Bisbenzyl-Derivate wie z.B. Dihydropinosylvin (Formel 4) oder Dihydropinosylvin-monomethylether (Formel 5) lassen sich durch selektive katalytische Hydrierung z.B. mit Pd/H_2 herstellen. Als Edukte kommen hierbei stilbenhaltige Rohextrakte aus stilbenhaltigen Pflanzen (z.B. *Pinus*-, *Alnus*-, *Polygonum*-, *Dalbergia*-, *Scutellaria* oder *Lindera*-Arten), chromatographi-

sche Fraktionen von Pflanzenextrakten mit einem erhöhten Gehalt an Stilbenen sowie aus Pflanzenextrakten in hochreiner Form gewonnene Stilbene in Betracht. Alternativ können Bisbenzyl-Derivate der Formel 1 auch direkt aus Bisbenzyl-Derivat-haltigen Pflanzen wie zum Beispiel *Pinus*-oder *Dioscorea*-Arten isoliert werden. Darüber hinaus können Bisbenzyl-Derivate der Formel 1 natürlich auch gezielt mit literaturbekannten Syntheseverfahren hergestellt werden.

**4****5**

Wirksamkeitsstudien mit durch katalytische Hydrierung hergestellten, bisbenzylhaltigen Pflanzenextrakten (als Substanzmischungen) sowie daraus isolierten reinen Bisbenzyl-Derivaten wie Dihydropinosylvin (Formel 4) und Dihydropinosylvinmonomethylether (Formel 5) belegen beispielhaft, dass Substanzen der Formel 1 (sowie ihre Gemische) eine starke antimikrobielle Wirkung gegenüber geruchsbildenden Mikroorganismen der menschlichen Haut wie *Corynebacterium xerosis*, *Staphylococcus epidermidis* und *Brevibacterium epidermidis* besitzen. Aufgrund ihrer hohen Stabilität gegenüber Licht und Sauerstoff können sie dabei im Gegensatz zu den entsprechenden Stilben-Derivaten hervorragend als Alternative oder als Ergänzung zu bekannten antimikrobiellen Wirkstoffen (wie z.B. Farnesol oder Triclosan) in Kosmetikprodukten und dergleichen als Deodorantien Einsatz finden.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel 1 sind darüber hinaus auch gegenüber *Propionibacterium acnes*, *Malassezia furfur* und Mykosen

verursachenden Keimen wie z.B. *Trichophyton rubrum* gut wirksam, so dass sie auch zur Behandlung (Bekämpfung) von Akne, als Antischuppenmittel oder bei der Behandlung von Mykosen (insbesondere Dermatomykosen) eingesetzt werden können.

Aufgrund ihres breiten Wirksamkeitsspektrums und insbesondere aufgrund ihrer Wirksamkeiten auch gegenüber gramnegativen Bakterien wie *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa*, gegenüber Hefen wie *Candida albicans* und gegenüber Pilzen wie *Aspergillus niger* (Tabelle 2; Wirksamkeit zum Teil bereits aus der Literatur bekannt, s.o.) sind die erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel 1 auch hervorragende Mittel zur Konservierung beispielsweise kosmetischer und/oder pharmazeutischer Formulierungen. Die Verwendung von Co-Konservierungsmitteln ist deshalb bei Verwendung von Verbindungen der Formel 1 (wobei R₁ bis R₄ die oben angegebene Bedeutung besitzen) regelmäßig nicht erforderlich.

Neben der Verwendung als antimikrobieller Wirkstoff eignen sich Dihydropinosylvin-Derivate der Formel 1 (wobei R₁ bis R₄ die vorstehend angegebenen Bedeutungen besitzen) auch als (kosmetische) Mittel insbesondere zur Hautaufhellung. Sie sind dazu geeignet, das Enzym Tyrosinase zu hemmen und somit einen Schlüsselschritt in der Melanin-Synthese, nämlich die Umwandlung von Tyrosin zu L-Dopachinon sowie die anschließende Oxidation zu Dopachinon zu unterbinden. In Anwesenheit der erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel 1 (wobei R₁ bis R₄ die vorstehend angegebenen Bedeutungen besitzen), entsteht weniger Dopachinon, was zu einer geringeren Melanin-Produktion führt, woraus dann wiederum eine Aufhellung der Haut resultiert. Deshalb können die besagten Dihydropinosylvin-Derivate als kosmetische Mittel oder wirksame Bestandteile kosmetischer Mittel insbesondere zur Behandlung von Altersflecken und Sommersprossen eingesetzt werden.

Entsprechende eigene Untersuchungsreihen zeigten, dass sowohl Pflanzenextrakte, die eine oder mehrere Verbindungen der Formel 1 umfassen (wobei R₁ bis R₄ die oben angegebenen Bedeutungen besitzen) als auch reine Bisbenzyl-Derivate der Formel 1 (wobei R₁ bis R₄ die angegebenen

Bedeutungen besitzen) Tyrosinase-inhibierende Eigenschaften besitzen. Dihydropinosylvin etwa ist in seiner Wirksamkeit um ca. den Faktor 10 stärker wirksam als kommerziell verfügbare Hautaufhellungsmittel wie z.B. Hydrochinon oder Kojisäure. Im Vergleich mit dem, wie jetzt nachgewiesen, ebenfalls hautaufhellend wirksamen Stilben Pinosylvin ist Dihydropinosylvin stärker wirksam und auch aufgrund seiner deutlich höheren Stabilität im Einsatz vorteilhaft.

Bevorzugt sind zur Behandlung der genannten Mikroorganismen und/oder zur Behandlung (Inhibierung) von Tyrosinase, Tyrosinase-Isoenzymen und deren Mischungen Verbindungen der Formel 1, in denen R_1 Wasserstoff ist und R_2 ausgewählt ist aus der Gruppe, die aus

- Methyl,
 - geradkettiges oder verzweigtes, gesättigtes oder ungesättigtes Alkyl mit 2-10 C-Atomen und
 - durch ein oder mehrere Sauerstoff- und/oder Schwefelatome unterbrochenes Alkyl mit 2-10 C-Atomen
- besteht.

Weiter bevorzugt sind Verbindungen der Formel 1, in denen R_1 Wasserstoff ist und R_2

- Wasserstoff oder
 - Methyl
- ist.

In einem erfindungsgemäßen Verfahren zur Inhibierung

- (a) eines Enzyms, das aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Tyrosinase, Tyrosinase-Isoenzymen und deren Mischungen besteht und/oder
- (b) eines Mikroorganismus, der aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus (i) Schuppen verursachenden Mikroorganismen, (ii) Körpergeruch verursachenden Mikroorganismen, (iii) Akne verursachenden Mikroorganismen, (iv) Mykosen verursachenden Mikroorganismen und deren Mischungen besteht,

werden das Enzym und/oder der Mikroorganismus mit einer inhibierend wirkenden Menge einer Verbindung der Formel 1 oder einer Substanzmischung, die eine oder mehrere Verbindungen der Formel 1 umfasst, kontaktiert. Die Gruppen R_1 bis R_4 besitzen hierbei die vorstehend angegebenen Bedeutungen, wobei die Angaben zu den bevorzugten Gruppen R_1 bis R_4 ebenfalls zutreffen. Die Inhibierung erfolgt hierbei regelmäßig aus kosmetischen Gründen, kann aber in Ausnahmefällen auch einen therapeutischen Charakter besitzen.

Ein wesentlicher Anwendungsbereich von Bisbenzyl-Derivaten der Formel 1 (wobei R_1 bis R_4 die angegebenen Bedeutungen besitzen) ist die Hemmung der für die Bildung von Körpergeruch (inkl. Achsel- und Fußgeruch) verantwortlichen Bakterien (insbesondere *Staphylococcus*-, *Corynebacterium*- und *Brevibacterium*-Arten). Darüber hinaus können Bisbenzyl-Derivate der Formel 1 auch zur Hemmung Mykosen verursachender Haut- und Nagelpilze (Dermatomykosen, Nagelmykosen; *Trichophyton*- und *Epidermophyton*-Arten), zur Hemmung für Schuppenbildung verantwortlicher Mikroorganismen (*Malassezia furfur*, Syn.; *Pityrosporum ovale* oder *P. orbiculare*) und zur Behandlung von Akne (Hemmung des Wachstums von *Propionibacterium acnes*) eingesetzt werden. Eine Wirksamkeit auch gegenüber Pilzen wie *Aspergillus niger* und Hefen wie *Candida albicans*, sowie in Konzentrationen von mindestens 2200 ppm auch gegenüber gramnegativen Bakterien wie z.B. *Escherichia coli* oder *Pseudomonas aeruginosa* erlaubt darüber hinaus auch eine Verwendung der beschriebenen Bisbenzyl-Derivate der Formel 1 als Konservierungsmittel (wobei auf Co-Konservierungsmittel mit antimikrobieller Wirkung gegen die genannten Mikroorganismen verzichtet werden kann).

Die Verbindungen der Formel 1 (oder entsprechende Mischungen solcher Verbindungen) werden, insbesondere soweit sie gegen Körpergeruch verursachende Keime und/oder zur Hautaufhellung eingesetzt werden, in der Regel topisch in Form von Lösungen, Cremes, Lotionen, Gelen, Sprays o.dgl. appliziert. Für andere Zwecke ist in manchen Fällen eine orale (Tabletten, Kapseln, Pulver, Tropfen), intravenöse, intraoculare, intraperitoneale

oder intramuskuläre Applikation oder eine Applikation in Form eines imprägnierten Verbands sinnvoll.

Die Konzentration der Wirkstoffe (Bisbenzyl-Derivate) der Formel 1 in den (topisch) zu applizierenden Formulierungen liegt vorzugsweise im Bereich von 0,0008% - 20 Gew.-% und bevorzugt im Bereich von 0,05%-0,5 Gew.-%. Der antimikrobielle Wirkstoffkomplex kann hierbei (a) prophylaktisch oder (b) im Bedarfsfall zum Einsatz kommen.

Die Konzentration der z.B. täglich zu applizierenden Wirkstoffmenge ist unterschiedlich und hängt vom physiologischen Zustand des Probanden sowie individualspezifischen Parametern wie Alter oder Körpergewicht ab. Bisbenzyl-Derivate der Formel 1 können sowohl allein, als Gemische oder auch in Kombination mit weiteren antimikrobiell wirksamen Substanzen zum Einsatz gelangen.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel 1 sind aber selbstverständlich nicht nur zur Applikation auf den menschlichen oder tierischen Körper vorgesehen, sondern sind beispielsweise auch zur Behandlung von Mikroorganismen auf oder in unbelebter Materie sowie zur Konservierung verderblicher Artikel geeignet.

Ein erfindungsgemäßes Verfahren zur Konservierung eines verderblichen Artikels gegen einen Befall durch Mikroorganismen, die aus der Gruppe ausgewählt sind, die aus (i) Schuppen verursachenden Mikroorganismen, (ii) Körpergeruch verursachenden Mikroorganismen, (iii) Akne verursachenden Mikroorganismen, (iv) Mykosen verursachenden Mikroorganismen und deren Mischungen besteht, umfasst die Ausrüstung des verderblichen Artikels mit einer gegenüber den genannten Mikroorganismen inhibierend oder abtötend wirkenden Menge einer Verbindung der Formel 1, wobei hinsichtlich der Reste R_1 bis R_4 das vorstehend Gesagte (auch hinsichtlich der bevorzugten Auswahl) zutrifft.

Die Verbindungen der Formel 1 (wobei R_1 bis R_4 die oben angegebenen Bedeutungen besitzen und auch hinsichtlich der bevorzugten Bedeutungen

von R₁ bis R₄ das vorstehend Gesagte gilt) können auch als Bestandteil von kosmetischen Mitteln und Duftstoffkompositionen (Riechstoffkompositionen) eingesetzt werden und beispielsweise einem parfümierten Fertigprodukt eine antimikrobielle Wirkung verleihen. Eine besonders bevorzugte Duftstoffkomposition umfasst (a) eine sensorisch wirksame Menge eines Duftstoffes, (b) eine antimikrobiell wirkende Menge einer oder mehrerer Verbindungen der Formel 1 (wobei R₁ bis R₄ die oben angegebenen Bedeutungen besitzen können) sowie ggf. (c) einen oder mehrere Trägerstoffe und/oder Zusatzstoffe. Da der Anteil an Parfüm in einem kosmetischen Fertigprodukt häufig im Bereich von ca. 1 Gew.-% liegt, wird ein Parfüm, welches eine Verbindung der Formel 1 enthält, vorzugsweise zu etwa 5 bis 50 Gew.-% aus einer oder mehrerer Verbindungen der Formel 1 bestehen. Als besonders vorteilhaft hatte sich erwiesen, dass die Substanzen der Formel 1 nur einen schwachen Eigengeruch besitzen oder gar völlig geruchlos sind; denn diese Eigenschaft prädestiniert sie für den Einsatz in einer Duftstoffkomposition.

Bevorzugte Ausgestaltungen und weitere Aspekte der vorliegenden Erfindung ergeben sich aus den beigefügten Patentansprüchen und den nachfolgenden Beispielen.

Beispiele 1 bis 4: Herstellung von Bisbenzyl-haltigen Extrakten sowie Bisbenzyl-Derivaten der Formel 1

Beispiel 1:

Extraktion von *Pinus sylvestris* Kernholz

2 kg *Pinus sylvestris* Kernholz-Späne werden mit 14 kg Ethanol 1 Stunde unter Rückfluß extrahiert. Nach Filtration und Einengen zur Trockne werden 100 g Trockenextrakt erhalten (Gehalt nach HPLC: 1.8% Pinosylvlin, 6.8% Pinosylvlinmonomethylether). Dieser wird in 250 ml Methanol aufgenommen und fünfmal mit jeweils 250 g Hexan extrahiert. Einengen zur Trockne ergibt 25 g *Pinus sylvestris* Extrakt (Gehalt nach HPLC: 7.2% Pi-

nosylvin, 29.5% Pinosylvinmonomethylether, daneben eine Reihe von Di-terpensäuren).

Beispiel 2:

Isolierung von Pinosylvin und Pinosylvinmonomethylether aus *Pinus sylvestris* Extrakt

20 g *Pinus sylvestris* Extrakt gemäß Beispiel 1 werden über Kieselgel 60 chromatographiert (Eluent: Hexan/Diethylether-Gradient 70:30 → 30:70), wodurch die zwei angereicherten Fraktionen I und II erhalten werden. Aus Fraktion I wird durch RP18-Mitteldruckchromatographie (Säule: YMC ODS-AQ, Eluent: Methanol/Wasser 80:20 + 0.5 ml Essigsäure/l, λ 270 nm) Pinosylvinmonomethylether isoliert (Reinheit: 97%). Nach RP18-Mitteldruckchromatographie (Säule: YMC ODS-AQ, Eluent: Methanol/Wasser 60:40 + 0.5 ml Essigsäure/l, λ 270 nm) von Fraktion II wird Pinosylvin erhalten (Reinheit 98%). Spektraldaten für Pinosylvin und Pinosylvinmonomethylether: vgl. Tabelle 2.

Beispiel 3:

Katalytische Hydrierung von *Pinus sylvestris* Kernholz-Extrakt gemäß Beispiel 1

1 g *Pinus sylvestris* Extrakt gemäß Beispiel 1 wird in 50 ml Ethanol aufgenommen und in Gegenwart von Palladium (5% auf Aktivkohle) mit Wasserstoff hydriert. Ausbeute: 935 mg.

Beispiel 4:

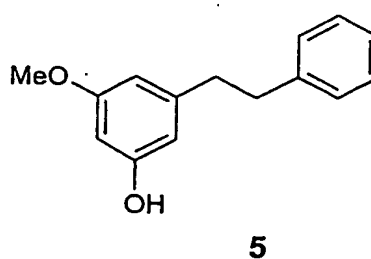
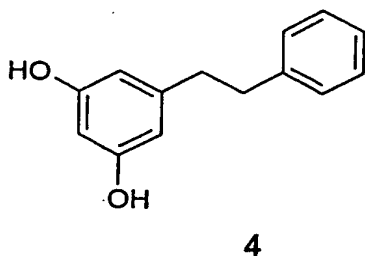
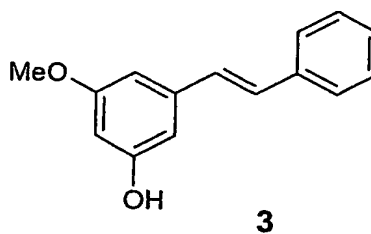
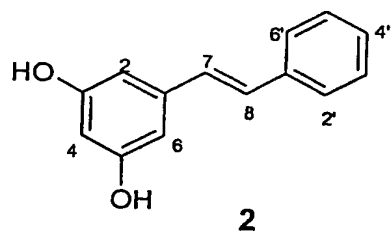
Katalytische Hydrierung der gemäß Beispiel 2 isolierten Stilbene Pinosylvin und Pinosylvinmonomethylether

1 g Stilben wird in 50 ml Ethanol aufgenommen und in Gegenwart von Palladium (5% auf Aktivkohle) mit Wasserstoff hydriert. Ausbeuten: Dihydropi-

nosylvin 940 mg (Reinheit: 97%); Dihydropinosylvinmonomethylether: 925 mg (Reinheit 96%). Spektraldaten für Dihydropinosylvin und Dihydropinosylvinmonomethylether: vgl. Tabelle 2.

Tabelle 2: ^{13}C -NMR-Daten für Pinosylvin (2), Pinosylvinmonomethylether (3), Dihydro-pinosylvin (4) und Dihydropinosylvinmonomethylether (5)

Pos.	δ_{c} (ppm)			
	2	3	4	5
1	140.3	140.3	144.9	144.9
2	106.0	107.0	107.7	106.2
3	159.6	159.5	159.6	159.3
3-OMe		55.4		55.3
4	103.2	101.9	101.1	99.8
5	159.6	162.1	159.6	161.8
6	106.0	104.3	107.7	108.8
7	129.7	129.4	38.6	38.7
8	129.1	129.6	38.2	38.3
1'	138.3	138.2	142.8	142.8
2'/6'	127.3	127.3	129.2	129.2
3'/5'	129.4	129.4	129.0	129.0
4'	128.3	128.3	126.5	126.6



Beispiel 5:

A: Untersuchungen zur antimikrobiellen Wirkung von Bisbenzyl-haltigem Pinus sylvestris Extrakt, Dihydropinosylvin (4) und Dihydropinosylvinmonomethylether (5)

Die Erkenntnis, dass Bisbenzyl-Derivate der Formel 1 (wobei R jede der oben angegebenen Bedeutungen besitzen kann) hervorragend zur Bekämpfung von Keimen geeignet sind, die für Körpergerüche verantwortlich sind, geht auf Untersuchungsreihen zurück, in der die besonders relevanten Keime *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium xerosis* und *Brevibacterium epidermidis* behandelt wurden. Nachfolgend werden jedoch nicht nur die Ergebnisse für die Hemmung von *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium xerosis* und *Brevibacterium epidermidis* angegeben, sondern auch die Ergebnisse weiterer Tests. Es zeigte sich nämlich, dass die Aktivität der genannten Bisbenzyl-Derivate auch gegenüber weiteren Testkeimen wie *Malassezia furfur*, *Trichophyton rubrum*, *Propionibacterium acnes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* und *Aspergillus niger* hoch ist, wodurch sich zusätzliche Anwendungsgebiete ergeben.

Allgemeine Testbedingungen:

Der Nachweis der antimikrobiellen Wirkung der gemäß den Beispielen 1-4 synthetisierten Substanzen erfolgte mit Hilfe des Agardilutionsverfahren in Anlehnung an DIN 58 940/ICS und DIN 58 944/ICS. Es wurden Petrischalen von 5,5 cm Durchmesser mit 8,7 ml frisch hergestelltem und bei 50 °C flüssig gehaltenem Mueller-Hinton-Agar (Merck, Art. 1.05437 bzw. Wilkins-Chalgren-Agar-Boillon, Oxoid, Art. CM 643, supplementiert mit 10 g Agar-Agar/Liter) beschickt, denen die verschiedenen Konzentrationen der verdünnten Proben in 3,3 Vol.-% = 0,3 ml zugesetzt wurden. Für den Testkeim *Malassezia furfur* wurde Mueller-Hinton-Agar verwendet, der 3% Tween80 (Merck, Art. 8.22 187) enthielt.

2,6 ml der 6,6%-igen Proben wurden mit Ethanol (96%; Merck, Art. 1.00971) verdünnt. Durch fortlaufende 2:1-Verdünnung mit Ethanol (96%-

ig) wurden die weiteren Testkonzentrationen der jeweiligen Verdünnungsreihen, die in Form geometrischer Reihen angelegt wurden, hergestellt.

Durch eine weitere Verdünnung mit dem Testagar (0,3 ml Probe bzw. entsprechender Verdünnungen + 8,7 ml Agar) wurden jeweils 30-fach niedrigere Endkonzentrationen erreicht (entspricht einer Anfangskonzentration von jeweils 2200 ppm). Die im folgenden angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf die Reinsubstanz und sind in ppm umgerechnet. Pro Testkonzentration und Nährmedium wurden 2 Agarplatten gegossen.

Es wurden folgende Untersuchungen mit jeweils 2 Agarplatten durchgeführt:

K1: 9,0 ml Mueller-Hinton-Agar	(unbeimpft)
K2: 8,7 ml Mueller-Hinton-Agar + 0,3 ml Ethanol (96%)	(unbeimpft)
K3: 8,7 ml Mueller-Hinton-Agar + 0,3 ml Ethanol (96%)	(beimpft)
K4: 9,0 ml Mueller-Hinton-Agar	(beimpft)
K5: 9,0 ml Wilkins-Chalgren-Agar	(unbeimpft)
K6: 8,7 ml Wilkins-Chalgren Agar + 0,3 ml Ethanol (96%)	(unbeimpft)
K7: 8,7 ml Wilkins-Chalgren Agar + 0,3 ml Ethanol (96%)	(beimpft)
K8: 9,0 ml Wilkins-Chalgren Agar	(beimpft)
K9: 9,0 ml Wilkins-Chalgren-Agar	(unbeimpft)
K10: 8,7 ml M.-H. Agar + 3% Tween80 + 0,3ml Etanol (96%ig)	(unbeimpft)
K11: 8,7 ml M.-H. Agar + 3% Tween80 + 0,3ml Etanol (96%ig)	(beimpft)
K12: 9,0 ml M.-H. Agar + 3% Tween80	(beimpft)

Nach Verfestigung und Trocknung (ca. 1 h bei 37 °C) wurden die Testplatten punktförmig mit jeweils 1 µl der in den nachfolgenden Beispielen aufgeführten Testkeimsuspensionen beimpft. Zur Überprüfung von Reinheit und Identität wurden die aerob wachsenden Bakterien (*Brevibacterium epidermidis*, *Corynebacterium xerosis*, *Staphylococcus aureus*; *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*) auf Columbia Blut-Agar (BioMérieux, Art. 43049). Der Schimmelpilz *Aspergillus niger*, die Hefe *Candida albicans* und die beiden Hautpilze *Trichophyton rubrum* und *Epidermophy-*

ton floccosum wurden auf Sabouraud-Agar (BioMérieux, Art. 43555) kultiviert. *Malassezia furfur* wurde auf Sabourad-HLT-Agar mit Enthemmern (Zusatz von Tween80: 1%; Lecithin: 0,3%; Histidin: 0,1%; Merck, Art. 1.18368) angezüchtet. *Propionibacterium acnes* wurde auf Schaedler-Agar (BioMérieux, Art. 43273) kultiviert. Weitere Angaben zu den behandelten Testkeimen sind Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3: Testkeime (Stammbezeichnungen) und Keimzahlen

Testkeim	Stammbez.	KBE*/ml
<i>Brevibacterium epidermidis</i>	ATCC 35514	$3,5 \times 10^7$
<i>Corynebacterium xerosis</i>	ATCC 7711	$2,2 \times 10^7$
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11229	$1,8 \times 10^7$
<i>Propionibacterium acnes</i>	ATCC 11829	$2,3 \times 10^8$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	$2,3 \times 10^7$
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228	$2,9 \times 10^7$
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	$2,0 \times 10^7$
<i>Malassezia furfur</i>	DSM 6171	$2,8 \times 10^7$
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 16404	$2,5 \times 10^7$
<i>Epidermophyton floccosum</i>	CBS 55384	$2,1 \times 10^7$
<i>Trichophyton rubrum</i>	DSM 4167	$2,5 \times 10^7$
KBE* = koloniebildende Einheiten		

Die Herstellung der Testkeimsuspensionen der aerob wachsenden bakteriellen Keime erfolgte durch Bebrütung von Mueller-Hinton-Bouillon (Merck, Art. 1.10293) bei 36 °C, die mit wenigen Einzelkolonien der jeweiligen Testkeime beimpft worden war. Nach dem Erreichen einer deutlichen Trübung wurde den Suspensionen so viel sterile Nährbouillon zugegeben, dass deren Trübung dem McFarland Standard 0,5 entsprach (ca. $1,5 \times 10^8$ KBE/ml).

Zur Herstellung der übrigen Testkeimsuspensionen wurden die Teststämme auf den oben genannten, festen Nährmedien kultiviert, mittels sterilem Tupfer abgeerntet und in so viel Mueller-Hinton-Bouillon aufgenommen bzw. verdünnt, dass die Trübung der Suspensionen dem McFarland Standard 0,5 entsprach.

Alle Testkeimsuspensionen, mit Ausnahme von *Propionibacterium acnes*, wurden nochmals mit steriler Bouillon 1:10 verdünnt und deren Keimzahl im Oberflächenverfahren per Spiralometer ermittelt (Ergebnisse: siehe Tabelle 1).

Die inokulierten Platten wurden unter den in Tabelle 4 angegebenen Bedingungen bebrütet und anschließend ausgewertet. Als MHK (Minimale Hemmkonzentration) wurde die niedrigste Wirkstoffkonzentration angesehen, bei der makroskopisch kein Wachstum vorhanden ist. Minimales, kaum sichtbares Wachstum oder wenige kleine Einzelkolonien wurden als Hemmung bewertet.

Tabelle 4: Inokulation und Bebrütung

Testkeim	Stamm-Bez.	Wachstumsbedingungen	Nährmedium	Bebrütung
<i>Brevibacterium epidermidis</i>	ATCC 35514	Aerob	Mueller-Hinton-Agar	18h bei 36 °C
<i>Corynebacterium xerosis</i>	ATCC 7711	Aerob	Mueller-Hinton-Agar	18h bei 36 °C
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11229	Aerob	Mueller-Hinton-Agar	18h bei 36 °C
<i>Propionibacterium acnes</i>	ATCC 11829	Anaerob	Wilkins-Chalgren-Agar	72h bei 30 °C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	Aerob	Mueller-Hinton-Agar	18h bei 36 °C
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	Aerob	Mueller-Hinton-Agar	48h bei 30 °C

<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228	Aerob	Mueller-Hinton-Agar	18h bei 36 °C
<i>Malassezia furfur</i>	DSM 6171	Aerob	Mueller-Hinton-Agar + 3% Tween 80	72h bei 30 °C
<i>Trichophyton rubrum</i>	DSM 4167	Aerob	Mueller-Hinton-Agar	72h bei 30 °C
<i>Epidermophyton floccosum</i>	CBS 55384	Aerob	Mueller-Hinton-Agar	18h bei 36 °C
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 16404	Aerob	Mueller-Hinton-Agar	48h bei 30 °C

B: MHK-Werte von *Pinus sylvestris* Extrakt hydriert, Dihydropinosylvin und Dihydropinosylvinmonomethylether

Die MHK-Werte von *Pinus sylvestris* Extrakt, Dihydropinosylvin und Dihydropinosylvin-monomethylether wurden gemäß den unter A beschriebenen allgemeinen Testbedingungen bestimmt und sind in der nachfolgenden Tabelle 5 zusammengefasst.

MHK-Werte [ppm] für <i>Pinus sylvestris</i> Extrakt hydriert, Dihydropinosylvin (Formel 4) und Dihydropinosylvinmonomethylether (Formel 5)			
Keim	Extrakt aus <i>Pinus sylvestris</i> hydriert	Dihydropinosylvin	Dihydropinosylvinmonomethylether
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	138	138	69
<i>Corynebacterium xerosis</i>	138	138	69
<i>Brevibacterium epidermidis</i>	138	138	69
<i>Propionibacterium acnes</i>	35	275	138
<i>Malassezia furfur</i>	550	275	138
<i>Trichophyton rubrum</i>	35	69	8,5
<i>Epidermophyton floccosum</i>	35	138	17
<i>Escherichia coli</i>	>2200	2200	>2200

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>2200	2200	>2200
<i>Candida albicans</i>	275	275	138
<i>Aspergillus niger</i>	35	275	35

Eine deutliche Hemmung des Wachstums grampositiver, Körpergeruch verursachender Bakterien wie *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium xerosis*, *Brevibacterium epidermidis* bereits in Konzentrationen kleiner 0,015% konnte für die in Tabelle 5 aufgeführten Substanzen beobachtet werden. Die stärkste Wirksamkeit zeigte hierbei Dihydropinosylvinmonomethylether (*Staphylococcus epidermidis*: 69ppm = 69µg/ml; *Corynebacterium xerosis*: 69ppm = 69µg/ml; *Brevibacterium epidermidis*: 69 ppm = 69 µg/ml). Die Wirksamkeit gegenüber dem für Akne verantwortlichen *Propionibacterium acnes* ist hingegen bei *Pinus sylvestris* Extrakt besonders ausgeprägt (35ppm = 35µg/ml), obgleich auch bei Dihydropinosylvin (138 ppm = 138µg/ml) und bei Dihydropinosylvinmonomethylether eine deutliche Wirksamkeit zu beobachten ist. Auch gegenüber Hefen und Schimmelpilzen (*Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum*) konnten beträchtliche Wirksamkeiten beobachtet werden. Aufgrund der zu beobachtenden antimikrobiellen Wirkung auch gegenüber *Malassezia furfur* können Bisbenzyl-Derivate der. Formel 1 auch als Schuppenmittel Anwendung finden. Gegenüber *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli* erwies sich im gewählten Konzentrationsbereich nur das Dihydropinosylvin bei einer Dosierung von 2200 ppm = 2200 µg/ml als wirksam. Da die genannten Substanzen oder auch Gemische der Substanzen über ein sehr breites Wirksamkeitsspektrum verfügen, können Sie somit auch als Konservierungsmittel Einsatz finden.

Beispiel 6: Hautaufhellende Wirkung von Bisbenzyl-Derivaten der Formel 1

Vorbemerkung:

Die Tyrosinase ist eines der Schlüsselenzyme im Melanin-Biogeneseweg. Bei der Suche nach hautaufhellender Wirksamkeit ist man daher bestrebt, Substanzen zu finden, die das Enzym Tyrosinase hemmen und somit einen Schlüsselschritt in der Melaninsynthese, nämlich die Umwandlung von Tyrosin zu L-Dopa sowie die anschließende Oxidation zu Dopachinon zu

unterbinden. In Anwesenheit von Substanzen mit depigmentierenden Eigenschaften entsteht weniger Dopachinon, damit wird in Folge weniger Melanin produziert, was letztendlich eine Aufhellung der Haut bewirkt.

Untersuchung der Tyrosinase-inhibierenden Wirkung von stilben- bzw. bisbenzyl-haltigen Pflanzenextrakten sowie reinen Stilbenen und Bisbenzylderivaten:

Die hautaufhellende Wirksamkeit ausgewählter Substanzen wird nachfolgend näher beschrieben. Die erhaltenen Ergebnisse resultieren aus Testreihen 1 und 2 mit unterschiedlich aktiver Tyrosinase (siehe Tabelle 5: Werte für die als Tyrosinase-Inhibitor bekannte Substanz Kojisäure, die als Positivkontrolle verwendet wurde: 100 μMol bzw. 390 μMol). Um einen Vergleich der IC50-Werte aller untersuchten Extrakte bzw. Reinsubstanzen vornehmen zu können, werden neben den Absolutwerten (Werte in $\mu\text{g/ml}$ bzw. für Reinsubstanzen auch in μMol) auch die Wirksamkeiten relativ zur Wirksamkeit der Kojisäure angegeben (vgl. Tabelle 5 und 6).

Versuchsdurchführung:

Test 1:

1. Herstellung der Untersuchungslösungen:
 - a) Kojisäure (Positivkontrolle) bzw. eine der zu untersuchenden Testsubstanzen,
 - b) Tyrosinase (Fa. SIGMA T7755, isoliert aus Pilzen ;10 units, für 10 Minuten gemeinsam mit Positivkontrolle bzw. Testsubstanz auf Eis vorinkubiert) und
 - c) 5mM Tyrosin (SIGMA T8909) werden zusammen in 50mM Phosphatpuffer pH 7,5 vorgelegt
2. Die Untersuchungslösungen werden 1h bei 37°C inkubiert
3. Die Umwandlung von Tyrosin in Dopachinon wird spektralphotometrisch bestimmt: $\lambda = 450\text{nm}$

Dosierung: Positivkontrolle und Testsubstanzen

a) Positivkontrolle: Kojisäure 10mM, 5mM, 0,5mM, 0,05 mM und 0,005mM in Phosphatpuffer

b) Pinosylvin bzw. Dihydropinosylvin jeweils 10% in Ethanol : 0,015%, 0,05%, 0,15%, 0,5% und 1,5%;

Ergebnis:

Der IC₅₀-Wert (Wert der Konzentration, bei der eine 50%ige Inhibierung erreicht wird) für Kojisäure betrug bei Test 1 100µMol. Der Wert für Pinosylvin betrug 94µMol (= 21,2 µg/ml). Der IC₅₀ Wert für Dihydropinosylvin konnte in Testserie 1 nicht exakt ermittelt werden da er mit <70 µMol (d.h. < 14,9 µg/ml) unterhalb der niedrigsten noch getesteten Konzentration lag (vgl. Tabelle 5 und 6). Aufgrund dessen wurde der IC₅₀ für Dihydropinosylvin erst in Test 2 exakt ermittelt.

Test 2:

1. Herstellung der Untersuchungslösungen:

- a) Kojisäure (Positivkontrolle) bzw. eine der zu untersuchenden Testsubstanzen,
 - b) Tyrosinase (Fa. SIGMA T7755, isoliert aus Pilzen ;10 units, für 10 Minuten gemeinsam mit Positivkontrolle bzw. Testsubstanz auf Eis vorinkubiert) und
 - c) 5mM Tyrosin (SIGMA T8909)
- werden zusammen in 50mM Phosphatpuffer bei pH 7,5 vorgelegt

2. Die Untersuchungslösungen werden 1h bei 37°C inkubiert

3. Die Umwandlung von Tyrosin in Dopachinon wird spektralphotometrisch bestimmt $\lambda = 450\text{nm}$

Dosierung: Positivkontrolle und Testsubstanzen

- a) Positivkontrolle: Kojisäure 10mM, 5mM, 1mM, 0,1 mM und 0,01mM in Phosphatpuffer
- b) Dihydropinosylvin 10% in Ethanol:: 0,0015%, 0,005%, 0,015%, 0,15%;
- c) *Pinus sylvestris* Extrakt bzw. *Pinus sylvestris* Extrakt hydriert 10% in Ethanol: 0,015%, 0,05%, 0,15%, 0,5%, 1,5%

Ergebnis Test 2:

Der IC50-Wert für Kojisäure betrug bei Test 2 390µMol. Der IC50-Wert für Dihydropinosylvin betrug 38,0µMol (= 8,10 µg/ml). Die IC50-Werte für *Pinus sylvestris* Extrakt und *Pinus sylvestris* Extrakt hydriert lagen bei >1500 µg/ml bzw. 140 µg/ml (vgl. Tabelle 5 und 6).

Tabelle 5:

Tyrosinase-Inhibition von <i>Pinus sylvestris</i> Extrakten, Pinosylvin und Dihydropinosylvin			
Tabelle 5: IC50-Werte für Reinsubstanzen: [µmol]			
	Test 1	Test 2	IC50 relativ zu Kojic acid
Kojic Acid	100,00	390,00	1,00
<i>Pinus sylvestris</i>	/	/	/
Pinosylvin	94,00	/	0,94
<i>Pinus sylvestris</i> hydriert	/	/	/
Dihydropinosylvin	<70	38,00	0,10

Tabelle 6:

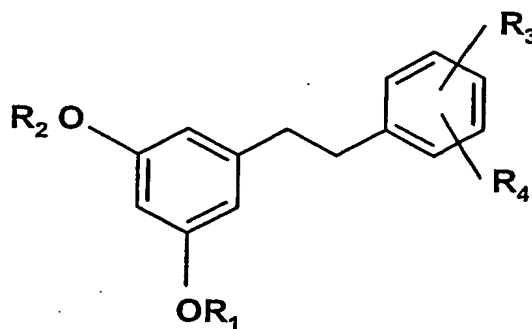
Tyrosinase-Inhibition von <i>Pinus sylvestris</i> Extrakten, Pinosylvin und Dihydropinosylvin			
Tabelle 6: IC50-Werte für Reinsubstanzen und Extrakte: [µg/ml]			
	Test 1	Test 2	IC50 relative zu Kojic acid
Kojic Acid	14,20	55,40	1,00
<i>Pinus sylvestris</i>	/	>1500	>27,00
Pinosylvin	21,20	/	1,49
<i>Pinus sylvestris</i> hydriert	/	140,00	9,86
Dihydropinosylvin	<14,90	8,10	0,15

Die Untersuchungen zeigen, daß Stilbene wie Pinosylvin, bisbenzylhaltige Pflanzenextrakte und Bisbenzyl-Derivate vom Typ des Dihydropinosylvins die Tyrosinase stark inhibieren und somit als hautaufhellende Mittel Einsatz finden können. Die stärkste Wirksamkeit wies hierbei das Dihydropinosylvin mit IC50-Werten von 38 µmol entsprechend einer Einsatzkonzentration

von ca. 8 µg/ml auf. Wie die relativen Werte zeigen, ist Dihydropinosylvin damit um ca. Faktor 10 stärker wirksam als der bekannte Tyrosinase-Inhibitor Kojisäure. Die untersuchten bisbenzyl-haltigen Pflanzenextrakte zeigen immer noch eine relativ gute Wirksamkeit, sind jedoch weniger wirksam als Kojisäure.

Ansprüche

1. Verwendung einer Verbindung der Formel 1 oder einer Substanzmischung, die eine oder mehrere Verbindungen der Formel 1 umfasst,

**1**

wobei

R_1 und R_2 unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe, die aus

- Wasserstoff,
- Methyl,
- geradkettiges oder verzweigtes, gesättigtes oder ungesättigtes Alkyl mit 2-10 C-Atomen und
- durch ein oder mehrere Sauerstoff- und/oder Schwefelatome unterbrochenes Alkyl mit 2-10 C-Atomen

besteht und

R_3 und R_4 unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe, die aus

- Wasserstoff,
- Hydroxy und
- Methoxy

besteht,

als Mittel zur

- (a) Inhibierung von Enzymen,
die aus der Gruppe ausgewählt sind, die aus Tyrosinase, Tyrosinase-Isoenzymen und deren Mischungen besteht und/oder
- (b) Behandlung von Mikroorganismen,
die aus der Gruppe ausgewählt sind, die aus (i) Schuppen verursachenden Mikroorganismen, (ii) Körpergeruch verursachenden Mikroorganismen, (iii) Akne verursachenden Mikroorganismen, (iv) Mykosen verursachenden Mikroorganismen und deren (v) Mischungen besteht.

2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei

R_1 Wasserstoff ist und

R_2 ausgewählt ist aus der Gruppe, die aus

- Wasserstoff,
 - Methyl,
 - geradkettiges oder verzweigtes, gesättigtes oder ungesättigtes Alkyl mit 2-10 C-Atomen und
 - durch ein oder mehrere Sauerstoff- und/oder Schwefelatome unterbrochenes Alkyl mit 2-10 C-Atomen
- besteht.

3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, wobei

R_1 Wasserstoff ist und

R_2

- Wasserstoff oder
 - Methyl
- ist.

4. Verfahren zur Inhibierung

- (a) eines Enzyms,

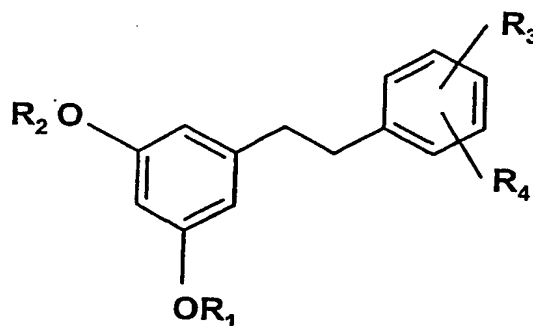
das aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Tyrosinase, Tyrosinase-Isoenzymen und deren Mischungen besteht und/oder

(b) eines Mikroorganismus,

der aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus (i) Schuppen verursachenden Mikroorganismen, (ii) Körpergeruch verursachenden Mikroorganismen, (iii) Akne verursachenden Mikroorganismen, (iv) Mykosen verursachenden Mikroorganismen und (v) deren Mischungen besteht,

worin

das Enzym und/oder der Mikroorganismus mit einer inhibierend wirkenden Menge einer Verbindung der Formel 1 oder einer Substanzmischung, die eine oder mehrere Verbindungen der Formel 1 umfasst, kontaktiert wird,



1

wobei

R₁ und R₂ unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe, die aus

- Wasserstoff,
- Methyl,
- geradkettiges oder verzweigtes, gesättigtes oder ungesättigtes Alkyl mit 2-10 C-Atomen und
- durch ein oder mehrere Sauerstoff- und/oder Schwefelatome unterbrochenes Alkyl mit 2-10 C-Atomen

besteht und

R_3 und R_4 unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe, die aus

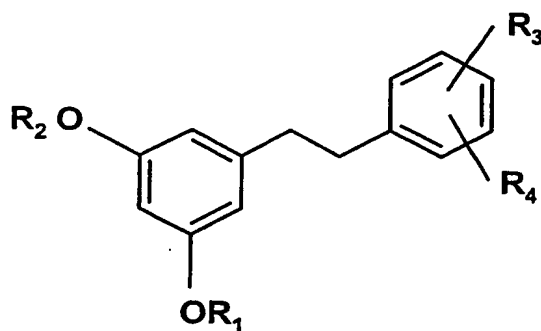
- Wasserstoff,
- Hydroxy und
- Methoxy

besteht.

5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei die inhibierend wirkende Menge der Verbindung oder des Substanzgemischs topisch auf einen menschlichen oder tierischen Körper appliziert wird.

6. Verfahren zur Konservierung eines verderblichen Artikels gegen einen Befall durch Mikroorganismen, die aus der Gruppe ausgewählt sind, die aus (i) Schuppen verursachenden Mikroorganismen, (ii) Körpergeruch verursachenden Mikroorganismen, (iii) Akne verursachenden Mikroorganismen, (iv) Mykosen verursachenden Mikroorganismen und (v) deren Mischungen besteht,

worin der verderbliche Artikel mit einer gegenüber den Mikroorganismen inhibierend oder abtötend wirkenden Menge einer Verbindung der Formel 1



1

ausgerüstet wird, wobei

R_1 und R_2 unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe, die aus

- Wasserstoff,
- Methyl,
- geradkettiges oder verzweigtes, gesättigtes oder ungesättigtes Alkyl mit 2-10 C-Atomen und
- durch ein oder mehrere Sauerstoff- und/oder Schwefelatome unterbrochenes Alkyl mit 2-10 C-Atomen

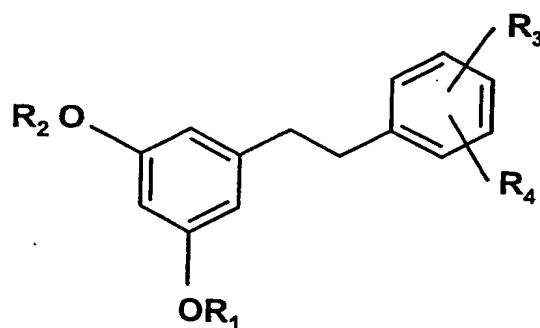
besteht und

R_3 und R_4 unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe, die aus

- Wasserstoff,
- Hydroxy und
- Methoxy

besteht.

7. Verfahren zur kosmetischen Aufhellung der menschlichen Haut, umfassend die topische Applikation einer Tyrosinase inhibierenden Menge einer oder mehrerer Verbindungen der Formel 1,



1

wobei

R_1 und R_2 unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe, die aus

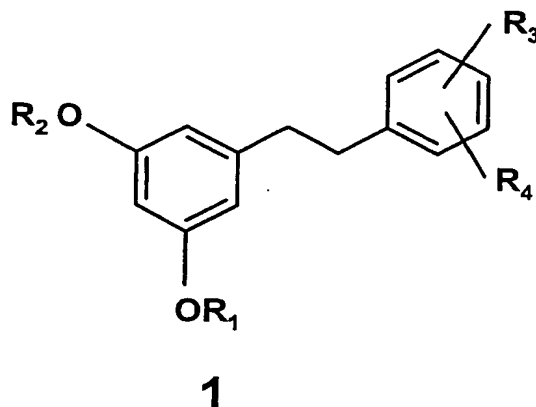
- Wasserstoff,
 - Methyl,
 - geradkettiges oder verzweigtes, gesättigtes oder ungesättigtes Alkyl mit 2-10 C-Atomen und
 - durch ein oder mehrere Sauerstoff- und/oder Schwefelatome unterbrochenes Alkyl mit 2-10 C-Atomen
- besteht und

R_3 und R_4 unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe, die aus

- Wasserstoff,
- Hydroxy und
- Methoxy.

8. Duftstoffkomposition, umfassend

- (a) eine sensorisch wirksame Menge eines Duftstoffes,
- (b) eine antimikrobiell wirkende Menge einer oder mehrerer Verbindungen der Formel 1



wobei

R_1 und R_2 unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe, die aus

- Wasserstoff,
- Methyl,
- geradkettiges oder verzweigtes, gesättigtes oder ungesättigtes Alkyl mit 2-10 C-Atomen und
- durch ein oder mehrere Sauerstoff- und/oder Schwefelatome unterbrochenes Alkyl mit 2-10 C-Atomen

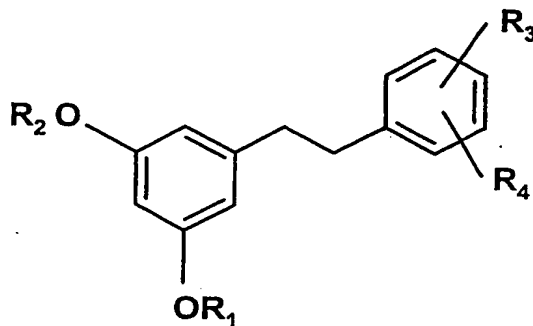
besteht und

R_3 und R_4 unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe, die aus

- Wasserstoff,
- Hydroxy und
- Methoxy

besteht.

9. Verwendung einer Verbindung der Formel 1 oder einer Substanzmischung, die eine oder mehrere Verbindungen der Formel 1 umfasst,



1

wobei

R_1 und R_2 unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe, die aus

- Wasserstoff,
 - Methyl,
 - geradkettiges oder verzweigtes, gesättigtes oder ungesättigtes Alkyl mit 2-10 C-Atomen und
 - durch ein oder mehrere Sauerstoff- und/oder Schwefelatome unterbrochenes Alkyl mit 2-10 C-Atomen
- besteht und

R_3 und R_4 unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe, die aus

- Wasserstoff,
- Hydroxy und
- Methoxy

besteht,

als kosmetisches Mittel.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/14041

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K7/32 A61K31/05

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K A61Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FAGBOUN D E ET AL: "DIHYDROSTILBENE PHYTOALEXINS FROM DIOSCOREA-ROTUNDATA" PHYTOCHEMISTRY (OXFORD), vol. 26, no. 12, 1987, pages 3187-3190, XP001146159 ISSN: 0031-9422	1-4,6
Y	Seite 3187, Formel in der rechten Spalte; Tabelle 2 und 3 ----- -/--	5,8,9

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but did to understand the principle or theory underlying the invention
- *X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 March 2003

Date of mailing of the international search report

03/04/2003

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Borst, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/14041

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MATSUURA H ET AL: "Antibacterial and antifungal compounds from Empetrum nigrum." PLANTA MEDICA, vol. 61, no. 6, 1995, page 580 XP009006909 ISSN: 0032-0943	1-4,6
Y	Seite 580, linke Spalte, Absatz 2; Tabelle 1	5,8,9
Y	EP 0 953 345 A (OREAL) 3 November 1999 (1999-11-03) Anspruch 7-9,12	5,8,9
Y	EP 1 029 530 A (OREAL) 23 August 2000 (2000-08-23) '0009!', '0034!'- '0042!	5,8,9
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 2002, no. 04, 4 August 2002 (2002-08-04) -& JP 2001 335472 A (KANSAI KOSO KK), 4 December 2001 (2001-12-04) abstract	7
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 013, no. 227 (C-600), 25 May 1989 (1989-05-25) -& JP 01 038009 A (POLA CHEM IND INC), 8 February 1989 (1989-02-08) abstract	7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP02/14041

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although Claims 1-5 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out on the basis of the alleged effects of the compound or composition (PCT Rule 39.1(iv)).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 02/14041

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0953345	A	03-11-1999	FR 2777184 A1 EP 0953345 A1 JP 11322561 A	15-10-1999 03-11-1999 24-11-1999
EP 1029530	A	23-08-2000	FR 2789577 A1 AU 1494100 A BR 0001925 A CN 1270804 A EP 1029530 A1 HU 0000697 A2 JP 2000247853 A KR 2000058089 A PL 338437 A1 US 2002198159 A1 US 6407142 B1 ZA 200000603 A	18-08-2000 14-09-2000 14-08-2001 25-10-2000 23-08-2000 28-02-2001 12-09-2000 25-09-2000 28-08-2000 26-12-2002 18-06-2002 05-09-2000
JP 2001335472	A	04-12-2001	NONE	
JP 01038009 2	A		NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/14041

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A61K7/32 A61K31/05

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K A61Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	FAGBOUN D E ET AL: "DIHYDROSTILBENE PHYTOALEXINS FROM DIOSCOREA-ROTUNDATA" PHYTOCHEMISTRY (OXFORD), Bd. 26, Nr. 12, 1987, Seiten 3187-3190, XP001146159 ISSN: 0031-9422	1-4,6
Y	Seite 3187, Formel in der rechten Spalte; Tabelle 2 und 3	5,8,9

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28. März 2003

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

03/04/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Borst, M

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/14041

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	MATSUURA H ET AL: "Antibacterial and antifungal compounds from Empetrum nigrum." PLANTA MEDICA, Bd. 61, Nr. 6, 1995, Seite 580 XP009006909 ISSN: 0032-0943	1-4,6
Y	Seite 580, linke Spalte, Absatz 2; Tabelle 1	5,8,9
Y	EP 0 953 345 A (OREAL) 3. November 1999 (1999-11-03) Anspruch 7-9,12	5,8,9
Y	EP 1 029 530 A (OREAL) 23. August 2000 (2000-08-23) '0009!, '0034!-'0042!	5,8,9
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 2002, no. 04, 4. August 2002 (2002-08-04) -& JP 2001 335472 A (KANSAI KOSO KK), 4. Dezember 2001 (2001-12-04) Zusammenfassung	7
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 013, no. 227 (C-600), 25. Mai 1989 (1989-05-25) -& JP 01 038009 A (POLA CHEM IND INC), 8. Februar 1989 (1989-02-08) Zusammenfassung	7

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

internationales Aktenzeichen
PCT/EP 02/14041

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. —
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Obwohl die Ansprüche 1-5 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung (Regel 39.1(iv) PCT).
2. ☐ Ansprüche Nr. —
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr. —
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. —
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt: —

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONAL RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/14041

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0953345 A	03-11-1999	FR 2777184 A1	15-10-1999
		EP 0953345 A1	03-11-1999
		JP 11322561 A	24-11-1999
EP 1029530 A	23-08-2000	FR 2789577 A1	18-08-2000
		AU 1494100 A	14-09-2000
		BR 0001925 A	14-08-2001
		CN 1270804 A	25-10-2000
		EP 1029530 A1	23-08-2000
		HU 0000697 A2	28-02-2001
		JP 2000247853 A	12-09-2000
		KR 2000058089 A	25-09-2000
		PL 338437 A1	28-08-2000
		US 2002198159 A1	26-12-2002
		US 6407142 B1	18-06-2002
		ZA 200000603 A	05-09-2000
JP 2001335472 A	04-12-2001	KEINE	
JP 01038009 2 A		KEINE	